

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-67696

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

C 1 2 Q 1/28

G 0 1 N 21/76

識別記号

序内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平5-221018

(22) 出願日

平成5年(1993)9月6日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 三苦 恵民

神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番5-106号

(72) 発明者 熊倉 幸子

神奈川県厚木市緑ヶ丘3丁目2-2-302

PTO 2002-5086

S.T.I.C. Translations Branch

(54) 【発明の名称】 バックグラウンド発光の低減法

(57) 【要約】

【目的】 2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体及び酸化剤を用いて酸化触媒であるヘム又はペルオキダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグラウンド発光の低減法の提供。

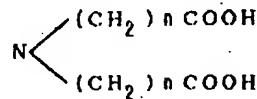
【構成】 特定の化学式で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定を実施することにより、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光を低減する。

BEST AVAILABLE COPY

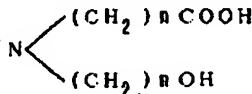
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式1~4（但しXはH、OH、COOH、n=1~3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグランド発光の低減法。

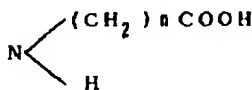
## 【化1】



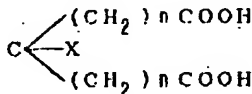
## 【化2】



## 【化3】



## 【化4】



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体及び酸化剤を用いて、酸化触媒であるヘム又はペルオキシダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグランド発光の低減法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】生体中の極微量物質の定量には、近年酵素免疫測定法（EIA）が用いられるようになってきたが、標識酵素の測定には蛍光基質を用いることが主流となっている。しかし蛍光物質の測定では、励起光の影響等で必ずしも高感度測定が容易ではなく、より高感度な測定が可能な発光基質を用いた酵素免疫測定法（CLEIA）が提案されている。

【0003】CLEIAに用いられる酵素として、アルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼ等が挙げられるが、アルカリフォスファターゼに使用される発光基質の場合、ジオキセタン構造を含む発光基質のリン酸基を加水分解する事により不安定化し、分解する際に発光するように設計されている。

【0004】ペルオキシダーゼの場合、単独でルミノール

ルを過酸化水素等の酸化剤と反応させると、酵素の絶対量として数フェントモル程度までは短時間の発光が認められるが、それ以下の量になるとバックグランド発光に隠されてしまい、測定が難しい。この問題に対しThorpe等は、フェノール誘導体やヒドロキシベンゾチアゾール等の化合物（エンハンサー）を上記の系に添加する事により発光が著しく増強し、且つ発光が長時間持続する事を報告している（Methods in Enzymology 133, p 331-353, 1986年）。これら一連のエンハンサーは、酸化剤とルミノールを混合した際に発生するバックグランド発光を低下させると同時に、ペルオキシダーゼ等の触媒による発光を増強する効果があり、これによりペルオキシダーゼは数10アトモル程度まで測定できるようになっている。ペルオキシダーゼを標識に使ったCLEIAにおいては、この増強反応を利用して従来より高感度に種々の測定項目が定量できるようになった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述のようなアルカリフォスファターゼ測定に使用される発光基質の場合、アルカリフォスファターゼの至適pHにおいて、これら発光基質のリン酸エステルの非酵素的な加水分解が起こりやすく、これに由来するバックグランド発光が生じやすいという課題がある。バックグランド発光が生じると、微量のアルカリフォスファターゼに由来する微小な発光がバックグランドと区別できないため、測定感度を高めることができないのである。

【0006】またペルオキシダーゼ測定に使用される発光基質やエンハンサーについても、微量のペルオキシダーゼを測定しようとする場合には前記アルカリフォスファターゼの場合と同様の課題がある。例えばエンハンサーを添加しても、依然バックグランド発光が高いレベルにあるため、そのレベル以下の発光はとらえる事が出来ないためである。

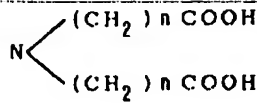
【0007】このように、この高いバックグランド発光を低く抑える方法の開発が高感度測定を達成するためには不可欠であった。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、ルミノール、酸化剤及びエンハンサーからなる系におけるバックグランド発光の低減法について鋭意研究した結果、本発明を完成した。すなわち本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式5~8（但しXはH、OH、COOH、n=1~3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグランド発光の低減法である。以下本発明を詳細に説明する。

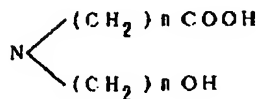
【0009】

【化5】



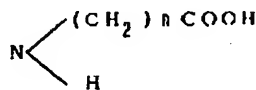
【0010】

【化6】



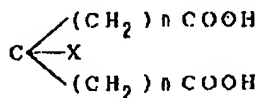
【0011】

【化7】



【0012】

【化8】



【0013】ルミノールに代表される2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジオン誘導体と過酸化水素等の酸化剤を弱アルカリ性の溶液中で混合すると、ヘムやペルオキシダーゼといった酸化触媒を添加しなくとも、あるレベルの発光が認められる。これが本発明でいうバックグランド発光である。このバックグランド発光は、反応系内に微量に存在する金属イオンに起因するものであることが確認された。従って本発明は、前記4種類の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上を共存させることによりバックグランド発光を低減するものである。

【0014】このような性質を持つ化合物としては、例えば、trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate 及びその塩、N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine 及びその塩、1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Diethylenetriamine-N,N,N',N',N''-pentaacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、1,6-Hexamethylethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid 及びその塩、Iminodiacetic acid 及びその塩、1,2-Diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Nitrilotriacetic acid 及びその

塩、Nitrilotripropionic acid 及びその塩、Triethylenetetramine-N,N,N',N',N'',N'''-hexaacetic acid

及びその塩、N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-teraacetic acid 及びその塩、クエン酸及びその塩等が例示できる。

【0015】系内に添加する化合物の濃度としては、0.01mMから5mM、好ましくは0.05mMから1.0mMが良い。これ以上の濃度で使用する場合、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合があるため、実施に先立ち、予備の実験を行い、添加濃度条件を決定しておくが良い。

【0016】前記のような官能基を有する化合物であっても、Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid 及びその塩のように水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含むキレート剤は、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合がある。

【0017】本発明で用いられる2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジオン誘導体として、例えばルミノール及びその誘導体、イソルミノール及びその誘導体、7-Dimethylaminonaphthalene-1,2-dicarboxylic acid hydrazide等が例示できる。酸化剤としては、例えば、過酸化水素、過ほう酸ソーダ等が例示できる。

【0018】バックグランド発光のみを低減する目的ではエンハンサーを加える必要がないが、バックグランド発光がより低い事が望ましい状況、即ち極低温度のヘム又はペルオキシダーゼの測定を行う場合、エンハンサーを併用すると効果的である。エンハンサーは、例えばp位置換フェノール誘導体(pヨードフェノール、4-フェニルフェノール他)、2-ヒドロキシケイヒ酸、ホタルルシフェリン及びその誘導体、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール等を例示できる。

【0019】本発明は、種々の起源のペルオキシダーゼについて適用可能であるが、特に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼに好適である。西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソマーの中では、特に塩基性アイソマーに好適であり、この時のpHとしては弱アルカリ性、pH8.0からpH9.5が良く、緩衝液としてはトリスヒドロキシメタン等のアミン系又はほう酸系等が好ましい。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、系内のバックグランド発光を低減し得、しかも酸化触媒に由来する発光は阻害することのない、即ちバックグランド発光のみを特異的に低減したヘム又はペルオキシダーゼの測定が可能である。本発明を用いればバックグランド発光が従来に比べて低く抑えられるため、従来バックグランド発光に埋もれていたヘム又はペルオキシダーゼによるシグナル発光を高感度に測定できる。また本発明は、ペルオキシダーゼ等を抗体の標識物として使用した、増強発光エンザイ

ムイムノアッセイ (Enhanced-CLEIA) に応用することが可能である。この場合、単にペルオキシダーゼ等の測定にとどまらず、種々の生体微量物質の高感度測定に応用できる。

#### 【0021】

【実施例】以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0022】実施例1

0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mM の表1に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、バックグランド発光 (カウント/分) を測定した。比較のため、4-フェニルフェノール、過酸化水素、ルミノールNa塩以外は含まない0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、同様にバックグランド発光を測定した。発光測定は市販の測定装置 (アロカ社製BLR-301) を使用し、それぞれ200  $\mu$ l の試料について、試薬調製後30秒から1 分間の発光量を積算した。結果を表1に示す。なお表1において、CyDTA はTrans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate を、DHEG はN,N-Bis(2hydroxyethyl) glycine を、EDDA は\*

\* Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid を、EDTA は Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid を、EGTA は 0,0'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid を、IDA は Iminodiacetic acid を、NTA は Nitrilotriacetic acid を、Arg. は アルギニンを、Asp. は アスパラギン酸を、Cys. は シスチンを、Glu.A は グルタミン酸を、His. は ヒスチジンを、Orn. は オルニチンを、Tyr. は チロシンを、2,3DCPyri. は 2,3-Dicarboxypyridine を、NM2,3DCPyri. は 1-2,3-dicarboxypyridine を、2,3DCPyra は 2,3-Dicarboxypyridine をそれぞれ示す。これら化合物のうち、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA、NTA は本発明の化合物としての性質を満たすもの、すなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0023】表1からは、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又はNTA を添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグランド発光が低減されていることがわかる。

#### 【0024】

#### 【表1】

試薬名	バックグランド発光量 (counts/min.)	試薬名	バックグランド発光量 (counts/min.)
無添加	1,820	Cys.	1,295
CyDTA	197	Glu.A	1,544
DHEG	346	His.	1,535
EDDA	649	Orn.	1,889
EDTA	799	Tyr.	1,071
EGTA	272	アミノ酸	1,422
IDA	465	2,3DCPyri.	11,784
NTA	205	NM2,3DCPyri.	3,317
Arg.	1,713	2,3DCPyra.	2,734
Asp.	1,361		

#### 【0025】実施例2

実施例1においてバックグランド発光の低減が認められた化合物、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又はNTA について、これら化合物がペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

【0026】0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mM の表2に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液※

※を調製し、250 アトモル (10 $\mu$ l) の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加した。添加後30秒から1 分間の発光を実施例1と同様に測定した。結果を表2に示す。表2から、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又はNTA がバックグランド発光の低減効果を有し、しかもペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかる。

#### 【0027】

#### 【表2】

7

8

試薬名	バックグラウンド発光 (counts/min.)	バックグラウンド添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	1,820	253,363	139.2
CyTDA	197	250,771	1272.9
DHEG	346	215,528	623.6
EDDA	649	239,032	368.3
EDTA	799	252,844	316.5
EGTA	272	231,688	851.8
IDA	465	249,905	537.4
NTA	205	240,664	173.9

## 【0028】実施例3

表3に示した化合物を0.1mM 又は1mM 濃度で使用した以外は実施例1と同様の操作を行い、バックグラウンド低減効果を調査した。結果を表3に示す。なお表3においてADA はN-(2-acetoamido)iminodiacetic acidを、DSはDextran Sulfatesodiumを、MOPSは3-(N-Morpholino)Propane-sulfonic Acid を、2,2Bipy は2,2Bipyridy を、o-Phnはo-Phenanthrolinをそれぞれ示す。なお、表3において、ADA 又はクエン酸は本発明の化合物としての性\*20 【表3】

\*質を満たすものすなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0029】表3からは、ADA、クエン酸又はDSを添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグラウンド発光が低減されていることがわかる。

## 【0030】

試薬名	バックグラウンド発光量 (Counts/min)	試薬名	バックグラウンド発光量 (Counts/min)
無添加	3,524	クエン酸 0.1mM	250
コハク酸0.1mM	3,978	1.0mM	79
1.0mM	4,375	酒石酸 0.1mM	4,600
シュウ酸0.1mM	4,040	1.0mM	1,821
1.0mM	1,071	MOPS 0.1mM	9,908
ADA 0.1mM	569	1.0mM	33,763
1.0mM	364	2,2Bipy.0.1mM	9,174
DS 0.1mM	508	o-Phn. 0.1mM	10,207

## 【0031】実施例4

実施例3において使用したADA、DS及びクエン酸について、これら化合物が実際にペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

【0032】0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mM の表4に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.5)溶液を調製し、250 アトモル(10 $\mu$ l)の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加し、添加後30秒から1 分間の発光※40 【表4】

※を実施例1と同様に測定した。結果を表4に示す。

【0033】表4から、本発明の化合物であるADA及びクエン酸はバックグラウンド発光の低減効果を有し、かつペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかるが、DSではバックグラウンド発光の低減効果が認められるもののペルオキシダーゼの酸化作用をも妨害していることがわかる。

## 【0034】

薬名	バックグラウンド発光量 (Counts/min)	バックグラウンド添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	3,524	253,363	71.9
ADA 0.1mM	569	171,911	302.1
1.0mM	364	115,223	316.5
DS 0.1mM	508	4,860	9.6
クエン酸0.1mM	250	211,125	844.5
1.0mM	79	189,262	2395.7

## 【0035】実施例5

甲状腺刺激ホルモン (TSH) に対するモノクローナル抗体をペプシン消化してF(ab)'<sub>2</sub>化した後、ゲルろ過及び疎水クロマトグラフにより精製し、ジチオスレイトールにより還元してFab化した。Fab化フラグメントはゲルろ過により精製し、これにSMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) で修飾した西洋ワサビペルオキシダーゼを加え37℃で1時間反応させた後、ゲルろ過により酵素標識抗体 (コンジュゲート) 画分を分取した。

【0036】分取したコンジュゲートはUV280nmの吸収を測定した後、4℃にて保存した。反応容器に抗TSH F(ab)<sub>2</sub>抗体を固相化した磁性ビーズ (φ=1.4mm) 12個を入れ、これにTSH ゼロ血清又は既知濃度 (4.81μIU/ml) 血清100μlを加え、37℃5分間攪拌しながら反応させた後、B/F分離を行い、0.1M NaCl、50mM トリス緩衝液、0.5% Tween 20 (pH8.5) を含む溶液で洗浄し、先に調製したコンジュゲート (希釈液にて200倍希釈したもの) 100μl加え、更に37℃10分間反応させ\*

\*た。次いでB/F分離後洗浄を5回行った後、発光検出

器 (アロカ社製BLR-301) にセットし、0.2mM 4-Phenylphenol、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩、0.1mM CyDTA、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を含む発光試薬200μlを加え、添加後30秒から1分間の発光量を実施例1と同様にして積算した。なお測定は、同一の被検液について5回ずつ行った。測定結果 (平均値、標準偏差、変動値、2SD法による検出下限界濃度を表5に示す。

- 10 【0037】表5からCyDTA添加系のS/N比 (陽性血清での発光量/ゼロ血清の発光量) は851であるのに対し、CyDTA非添加系でのS/N比は147であり、S/N比的に約6倍改善されたことがわかる。またCyDTAを添加した場合の検出下限界濃度は0.004であるのに対し、これを添加しなかった場合では0.017であり、検出下限界濃度も約6倍改善されたことがわかる。

【0038】

【表5】

	発光量 (counts/min)			
	CyDTA添加	CyDTA無添加	CyDTA添加	CyDTA無添加
TSH濃度 (μIU/ml)	陰性血清	陰性血清	陽性血清	陽性血清
	0	0	48.1	48.1
平均値	131	789	111,458	116,279
標準偏差	47	201	7,697	6,312
変動値(%)	36	25	7	5
検出下限界濃度	-	-	0.004	0.017

CLIPPED IMAGE- JP407067696A

PAT-NO: JP407067696A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07067696 A

TITLE: METHOD FOR REDUCING BACK GROUND LUMINESCENCE

PUBN-DATE: March 14, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

MITOMA, YOSHITAMI

KUMAKURA, SACHIKO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

TOSOH CORP

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP05221018

APPL-DATE: September 6, 1993

INT-CL\_(IPC): C12Q001/28; G01N021/76

ABSTRACT:

PURPOSE: To reduce only back ground luminescence and to enable measurement in high sensitivity by making a specific compound exist in measuring a peroxidase based on luminous reaction comprising a dihydrophthalazinedione derivative as a substrate.

CONSTITUTION: Luminescence occurring by treatment of a 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione derivative (e.g. luminol) with hem or a peroxidase (preferably one derived from horseradish) in the presence of an oxidizing agent (e.g. hydrogen peroxide) is measured in the presence of one or more compounds (e.g. citric acid) which contain a functional group of formula I to formula IV (X is H, OH or COOH; (n) is 1-3) or its salt, does not contain aromatic hydrocarbon containing OH and has chelating action. The measurement is carried out preferably at pH 8-9.5 and a boric acid-based buffering solution is preferable as the buffer solution. In the case of measuring hem or a peroxidase in an extremely low concentration, a combined use of an enhancer such as 6-hydroxybenzothiazole is preferably.

DERWENT-ACC-NO: 1995-143877  
DERWENT-WEEK: 199519  
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Reducing background luminescence in the detection of haem and peroxidase - comprises adding 2,3-di:hydro-1,4-phthala-di:one deriv(s). in the presence of an oxidising agent

PATENT-ASSIGNEE: TOSOH CORP[TOYJ]

PRIORITY-DATA: 1993JP-0221018 (September 6, 1993)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 07067696 A	March 14, 1995	N/A	006	C12Q 001/28

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP07067696A	N/A	1993JP-0221018	September 6, 1993

INT-CL\_(IPC): C12Q001/28; G01N021/76

ABSTRACTED-PUB-NO: JP07067696A

BASIC-ABSTRACT: Reducing background luminescence when detecting haem and peroxidase comprises: (i) treating a 2,3-dihydro-1,4-phthaladione deriv. with haem or peroxidase in the presence of an oxidising agent; and (ii) measuring the resultant luminescence due to 1 cpd. contg. 1 functional gp. of formulae (I) to (IV), where X = H, OH or COOH and n = 1-3. The cpds. do not possess any aromatic gps. but have a strong chelating action due to the abundance of their hydroxyl moieties.

ADVANTAGE - The method reduces background luminescence effectively without inhibiting any luminescence that originates from the oxidising agent and is therefore applicable to enhanced CLEIA.



**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19)【発行国】 日本国特許庁 (JP)	(19)[ISSUINGCOUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開平 7 - 6 7 6 9 6	(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined-Japanese-Patent 7-67696
(43)【公開日】 平成 7 年 ( 1 9 9 5 ) 3 月 1 4 日	(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] March 14th, Heisei 7 (1995)
(54)【発明の名称】 バックグラウンド発光の低減法	(54)[TITLE] Reduction method of background luminescence
(51)【国際特許分類第 6 版】 C12Q 1/28 6807- 4B G01N 21/76	(51)[IPC] C12Q 1/28 6807-4B G01N21/76
【審査請求】 未請求	[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 1	[NUMBEROFCLAIMS] One
【出願形態】 OL	[Application form] OL
【全頁数】 6	[NUMBEROFPAGES] Six
(21)【出願番号】 特願平 5 - 2 2 1 0 1 8	(21)[APPLICATIONNUMBER] Japanese Patent Application No. 5-221018
(22)【出願日】 平成 5 年 ( 1 9 9 3 ) 9 月 6 日	(22)[DATEOFFILING] September 6th, Heisei 5 (1993)
(71)【出願人】	(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]
【識別番号】	[IDCODE]

000003300

000003300

## 【氏名又は名称】

東ソー株式会社

Tosoh Corp.

## 【住所又は居所】

山口県新南陽市開成町4560  
番地

## [ADDRESS]

## (72)【発明者】

## (72)[INVENTOR]

【氏名】 三苦 恵民

Yoshitami Mitoma

## 【住所又は居所】

神奈川県藤沢市湘南台4丁目2  
6番5-106号

## [ADDRESS]

## (72)【発明者】

## (72)[INVENTOR]

【氏名】 熊倉 幸子

Sachiko Kumakura

## 【住所又は居所】

神奈川県厚木市緑ヶ丘3丁目2  
-2-302

## [ADDRESS]

## (57)【要約】

## (57)[SUMMARY]

## 【目的】

2, 3-ジヒドロ-1, 4-フ  
タラジオン誘導体及び酸化剤を  
用いて酸化触媒であるヘム又は  
ペルオキダーゼをそれらの触媒  
作用による発光反応に基づいて  
測定する場合の、バックグラン  
ド発光の低減法の提供。

## [OBJECT]

To provide the reduction method of background  
luminescence in the case of measuring heme or  
peroxidase which is an oxidation catalyst,  
based on luminous reaction by their catalytic  
actions using a 2,3- dihydro- 1,4-  
phthalazinedione derivative and an oxidizing  
agent.

## 【構成】

特定の化学式で示される官能基  
又はその塩を構造中に含み、且  
つ水酸基を有する芳香族炭化水

## [SUMMARY OF THE INVENTION]

A measurement is carried out in the presence of  
1 or more kinds of compounds which contain a  
functional group shown in a specific chemical  
formula or its salt, do not contain an aromatic

素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定を実施することにより、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光を低減する。

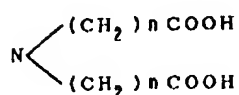
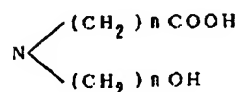
hydrocarbon which has a hydroxyl group, and have a chelate action, thereby reducing the background luminescence in a measurement of a heme or peroxidase.

**【特許請求の範囲】**
**[CLAIMS]**
**【請求項1】**

2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式1~4 (但しXはH、OH、COOH、n=1~3) で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法。

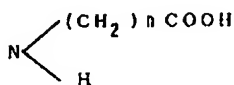
**[CLAIM 1]**

A reduction method of background luminescence in a measurement of a heme or peroxidase characterized in that light-emission produced by processing a 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione derivative with heme or peroxidase in the presence of an oxidizing-agent is measured in the presence of 1 or more compounds which contain a functional group or its salt shown in the following chemical formulas 1-4 (X is H, OH, COOH, n=1-3), and do not contain an aromatic hydrocarbon with a hydroxyl group, and have a chelate action.

**【化1】**
**[COMPOUND 1]**

**【化2】**
**[COMPOUND 2]**


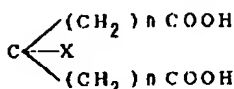
【化3】

[COMPOUND 3]



【化4】

[COMPOUND 4]



【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

[0001]

【産業上の利用分野】

本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体及び酸化剤を用いて、酸化触媒であるヘム又はペルオキシダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグランド発光の低減法に関するものである。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the reduction method of background luminescence in the case of measuring the heme or peroxidase which is an oxidation catalyst, based on the luminous reaction by their catalytic actions using a 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione derivative and an oxidizing agent.

【0002】

[0002]

【従来の技術】

生体中の極微量物質の定量には、近年酵素免疫測定法 (EIA) が用いられるようになってきたが、標識酵素の測定には蛍

[PRIOR ART]

The enzyme immunoassay (EIA) has come to be used for a fixed quantity of the ultralow-volume substance in a living body in recent years.

However, it is in power to use a fluorescent

光基質を用いることが主流となっている。しかし蛍光物質の測定では、励起光の影響等で必ずしも高感度測定が容易ではなく、より高感度な測定が可能な発光基質を用いた酵素免疫測定法 (CLEIA) が提案されている。

**[0003]**

CLEIAに用いられる酵素として、アルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼ等が挙げられるが、アルカリフォスファターゼに使用される発光基質の場合、ジオキセタン構造を含む発光基質のリン酸基を加水分解する事により不安定化し、分解する際に発光するように設計されている。

**[0004]**

ペルオキシダーゼの場合、単独でルミノールを過酸化水素等の酸化剤と反応させると、酵素の絶対量として数フェントモル程度までは短時間の発光が認められるが、それ以下の量になるとバックグラウンド発光に隠されてしまい、測定が難しい。この問題に対しThorpe等は、フェノール誘導体やヒドロキシベンゾチアゾール等の化合物 (エンハンサー) を上記の系に添加する事により発光が著しく増強し、且つ発光が長時間持続する事を報告している (Methods in Enzymology 133, p331-353, 1986 年)。これら一連のエンハンサーは、酸化剤とルミノールを混合した際に発生するバックグラウンド発光を低下させると同

substrate for a measurement of a marker enzyme.

However in a measurement of a fluorescent material, a high sensitive measurement is not necessarily easy under the influence of excitation light etc. The enzyme immunoassay (CLEIA) using the light-emission substrate which can perform a higher-sensitivity measurement is proposed.

**[0003]**

An alkali phosphatase, peroxidase, etc. are mentioned as an enzyme used for CLEIA. However, in the case of the light-emission substrate used to an alkali phosphatase, a destabilization is carried out by hydrolyzing the phosphoric-acid group of the light-emission substrate containing dioxatane structure.

When decomposing, it designs so that a light emission.

**[0004]**

When making a luminol react with oxidizing agents, such as a hydrogen peroxide, independently in the case of peroxidase, short-time light-emission will observe to the several femtomol level as an amount of absolute of an enzyme.

However, when becoming the quantity not more than it, it will be hidden in background luminescence, and a measurement is hard.

Thorpe etc. has reported that light-emission augments remarkably and light-emission continues for a long time by adding compounds (enhancer), such as a phenol derivative and a hydroxy benzothiazole, to the type of the above with respect to this problem. (Methods in Enzymology 133, p 331-353, 1986).

The enhancer of these series has the effect which augments the light-emission by catalyst of peroxidase etc., while making background luminescence generated when having mixed the oxidizing agent and the luminol reduce.

Thereby, peroxidase can be measured now to about several 10 atto mol.

時に、ペルオキシダーゼ等の触媒による発光を増強する効果があり、これによりペルオキシダーゼは数10アトモル程度まで測定できるようになっている。ペルオキシダーゼを標識に使ったCLEIAにおいては、この増強反応を利用して従来より高感度に種々の測定項目が定量できるようになった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

前述のようなアルカリフォスファターゼ測定に使用される発光基質の場合、アルカリフォスファターゼの至適pHにおいて、これら発光基質の磷酸エステルが非酵素的な加水分解が起こりやすく、これに由来するバックグラウンド発光が生じやすいという課題がある。バックグラウンド発光が生じると、微量のアルカリフォスファターゼに由来する微小な発光がバックグラウンドと区別できないため、測定感度を高めることができないのである。

【0006】

またペルオキシダーゼ測定に使用される発光基質やエンハンサーについても、微量のペルオキシダーゼを測定しようとする場合には前記アルカリフォスファターゼの場合と同様の課題がある。例えばエンハンサーを添加しても、依然バックグラウンド発光が高いレベルにあるため、その

In CLEIA using peroxidase as a label, A fixed quantity of various measurement items came be conventionally completed high-sensitivity using this augmentation reaction.

[0005]

**[PROBLEM ADDRESSED]**

In the case of the light-emission substrate used to the above alkali phosphatase measurements, In the optimum pH of an alkali phosphatase

The hydrolysis like a non-enzyme of the phosphoric ester of these light-emission substrate ease to occur, and the subject that it is easy to produce the background luminescence originating in this occurs.

Since the micro light-emission originating in a trace amount alkali phosphatase cannot distinguish with a back ground when background luminescence arises, a measurement sensitivity cannot be increased.

[0006]

About the light-emission substrate and the enhancer which are also used to a peroxidase measurement When it is going to measure trace amount peroxidase, the subject similar to the case of the above-mentioned alkali phosphatase occurs.

Since a high level has as always background luminescence even if it adds an example enhancer, the light-emission less than the level is because it cannot catch.

レベル以下の発光はとらえる事が出来ないためである。

**【0007】**

このように、この高いバックグラウンド発光を低く抑える方法の開発が高感度測定を達成するためには不可欠であった。

**[0007]**

Thus, it was essential in order for development of the method of controlling low this high background luminescence to achieve a high sensitive measurement.

**【0008】**

**【課題を解決するための手段】**  
本発明者等は、ルミノール、酸化剤及びエンハンサーからなる系におけるバックグラウンド発光の低減法について鋭意研究した結果、本発明を完成した。すなわち本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式5~8（但しXはH、OH、COOH、 $n=1\sim3$ ）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法である。以下本発明を詳細に説明する。

**[0008]****[SOLUTION OF THE INVENTION]**

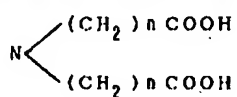
These inventors did earnestly research about the reduction method of background luminescence in the type consisting of a luminol, an oxidizing agent, and an enhancer.

As a result, this invention was completed. That is, this invention, Light-emission which produces a 2,3- dihydro- 1,4- phthalazinedione derivative by processing by the heme or peroxidase in an oxidizing-agent presence, It measures by being under 1 or more kinds of coexistence of the compound which has a chelate action which contains in structure the functional group or the its salt shown by the following chemical formula 5-8 (however X is H, OH, COOH,  $n=1-3$ ), and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

It is the reduction method of background luminescence in a measurement of the heme or peroxidase characterized by the above-mentioned.

This invention is explained in detail below.

**【0009】****[0009]****【化5】****[COMPOUND 5]**

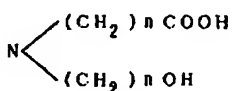


【0010】

[0010]

【化6】

[COMPOUND 6]

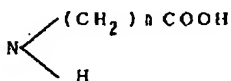


【0011】

[0011]

【化7】

[COMPOUND 7]

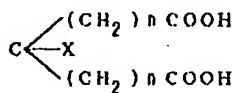


【0012】

[0012]

【化8】

[COMPOUND 8]



【0013】

[0013]

ルミノールに代表される2, 3  
 ジヒドロ-1, 4-フタラジ

When mixing the oxidizing agents represented  
 by the luminol, such as a 2,3- dihydro- 1,4-



オン誘導体と過酸化水素等の酸化剤を弱アルカリ性の溶液中で混合すると、ヘムやペルオキシダーゼといった酸化触媒を添加しなくとも、あるレベルの発光が認められる。これが本発明でいうバックグランド発光である。このバックグランド発光は、反応系内に微量に存在する金属イオンに起因するものであることが確認された。従って本発明は、前記4種類の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上を共存させることによりバックグランド発光を低減するものである。

## 【0014】

このような性質を持つ化合物としては、例えば、trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate 及びその塩、N,N-Bis(2hydroxyethyl)glycine 及びその塩、1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、1,6-

phthalazinedione derivative and a hydrogen peroxide, in a weakly alkaline solution, even if it will not add an oxidation catalyst said a heme and peroxidase, light-emission of a certain level observes.

This is background luminescence said by this invention.

It was confirmed that this background luminescence is a thing resulting from the metal ion which exists trace amount in a reaction system.

Therefore this invention reduces background luminescence by making 1 or more kinds of a compound which have a chelate action which contains in structure the 4 above-mentioned kinds of functional groups, or an its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group coexist.

## [0014]

As a compound with such a property For example, trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate, And an its salt, N, N-Bis(2hydroxyethyl) glycine, And an its salt, 1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And its-salt, Diethylenetriamine-N, N,N',N'',N''-pentaacetic acid, and an its salt, Ethylenediamine-N, N'-diacetic acid, And an its salt, Ethylenediamine-N, N'-dipropionic acid and dihydrochloride, And an its salt, N-(2-Hydroxyethyl) ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid, And an its salt, O, O'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, 1,6-Hexamethylethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, N-(2-Hydroxyethyl) iminodiacetic acid, And an its salt, Iminodiacetic acid and an its salt, 1,2-Diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, Nitrilotriacetic acid and an its salt, Nitrilotripropionic acid and an its salt, Triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N'''-hexaacetic acid, And an its salt, N-(2-

Hexamethylethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid 及びその塩、Iminodiacetic acid 及びその塩、1,2-Diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Nitrilotriacetic acid 及びその塩、Nitrilotripropionic acid 及びその塩、Triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid 及びその塩、N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-teraacetic acid 及びその塩、クエン酸及びその塩等が例示できる。

#### 【0015】

系内に添加する化合物の濃度としては、0.01mM から 5mM、好ましくは 0.05mM から 1.0mM が良い。これ以上の濃度で使用する場合、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合があるため、実施に先立ち、予備的実験を行い、添加濃度条件を決定しておくことが良い。

#### 【0016】

前記のような官能基を有する化合物であっても、Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid 及びその塩のように水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含むキレート剤は、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合がある。

acetoamido) iminodiacetic acid, And an its salt, O, O'-Bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N, N, N',N'-teraacetic acid, And an its salt, a citric acid, an its salt, etc. can be illustrated.

#### 【0015】

As concentration of the compound added in the system, they are 5 mM from 0.01 mM. Preferably, 0.05 mM to 1.0 mM are good.

Since the light-emission originating in catalytic activity, such as a heme and peroxidase, may be inhibited when using by the concentration beyond this, it is good to perform preliminary experiment to implementation prior to that, and to determine addition concentration conditions.

#### 【0016】

Even if it is the compound which has the above functional groups, the chelating agent which contains in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group like Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid and an its salt may inhibit the light-emission originating in catalytic activity, such as a heme and peroxidase.

## 【0017】

本発明で用いられる2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体として、例えばルミノール及びその誘導体、イソルミノール及びその誘導体、7-Dimethylaminonaphthalene-1,2-dicarboxylic acid hydrazide等が例示できる。酸化剤としては、例えば、過酸化水素、過ほう酸ソーダ等が例示できる。

## 【0018】

バックグラウンド発光のみを低減する目的ではエンハンサーを加える必要はないが、バックグラウンド発光がより低い事が望ましい状況、即ち極低濃度のヘム又はペルオキシダーゼの測定を行う場合、エンハンサーを併用すると効果的である。エンハンサーは、例えばp位置換フェノール誘導体(pヨードフェノール、4-フェニルフェノール他)、2-ヒドロキシケイヒ酸、ホタルルシフェリン及びその誘導体、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール等を例示できる。

## 【0019】

本発明は、種々の起源のペルオキシダーゼについて適用可能であるが、特に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼに好適である。西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソマーの中では、特に塩基性アイソマーに好適であり、この時のpHとしては弱アルカリ性、pH8.0からpH9.5が良く、緩衝液としてはトリスヒ

## 【0017】

As the 2,3- dihydro- 1,4- phthalazinedione derivative used by this invention, for example, a luminol and an its derivative, an iso luminol and an its derivative, and 7-Dimethylaminonaphthalene-1,2-dicarboxylic acid hydrazide etc. can be illustrated.

As an oxidizing agent, for example, a hydrogen peroxide, the perboric-acid soda, etc. can be illustrated.

## 【0018】

An enhancer does not need to be added for the objective which reduces only background luminescence.

However, when the thing with lower background luminescence performs a measurement of a preferable situation, that is, the heme of ultra-low concentration or peroxidase, it is effective when using an enhancer together.

An enhancer can illustrate p position substituted phenol derivative (p iodo phenol, 4-phenylphenol, et al.), 2-hydroxy cinnamic acid, firefly luciferin and an its derivative, 6- hydroxy benzothiazole, 4- (4- hydroxyphenyl) thiazole, etc., for example.

## 【0019】

Although this invention is applicable about peroxidase of the various origins, it is suitable for in particular peroxidase derived from a horseradish.

In particular in the isomer of a Western horseradish peroxidase, it is suitable for the basic isomer.

As pH at this time, alkalescent pH8.0 to pH9.5 is good, and an amine type or boric-acid types, such as tris hydroxy methane, etc. are preferable as buffer.

ドロキシメタン等のアミン系又はほう酸系等が好ましい。

【0020】

[0020]

**【発明の効果】**

本発明によれば、系内のバックグラウンド発光を低減し得、しかも酸化触媒に由来する発光は阻害することのない、即ちバックグラウンド発光のみを特異的に低減したヘム又はペルオキシダーゼの測定が可能である。本発明を用いればバックグラウンド発光が従来に比べて低く抑えられるため、従来バックグラウンド発光に埋もれていたヘム又はペルオキシダーゼによるシグナル発光を高感度に測定できる。また本発明は、ペルオキシダーゼ等を抗体の標識物として使用した、増強発光エンザイムイムノアッセイ (Enhanced-CLEIA) に応用することが可能である。この場合、単にペルオキシダーゼ等の測定にとどまらず、種々の生体微量物質の高感度測定に応用できる。

【0021】

[0021]

**【実施例】**

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

【0022】

**実施例 1**

0.2mM 4-フェニルフェノー

**[Example]**

Hereafter, an Example is shown and this invention is more specifically explained.

However, this invention is not limited only to an Example.

[0022]

**Example 1**

0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen

ル、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩及び 0.1mM の表 1 に示した化合物を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、バックグラウンド発光(カウント/分)を測定した。比較のため、4-フェニルフェノール、過酸化水素、ルミノール Na 塩以外は含まない 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、同様にバックグラウンド発光を測定した。発光測定は市販の測定装置 (アロカ社製 BLR-301) を使用し、それぞれ 200  $\mu$ l の試料について、試薬調製後 30 秒から 1 分間の発光量を積算した。結果を表 1 に示す。なお表 1 において、CyDTA は Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate を、DHEG は N,N-Bis(2hydroxyethyl)glycine を、EDDA は Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid を、EDTA は Ethylenediamine-N,N',N'-tetraacetic acid を、EGTA は O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N',N'-tetraacetic acid を、IDA は Iminodiacetic acid を、NTA は Nitrilotriacetic acid を、Arg. はアルギニン、Asp. はアスパラギン酸、Cys. はシステイン、Glu.A はグルタミン酸、His. はヒスチジン、Orn. はオルニチン、Tyr. はチロシン、2,3DCPyri. は 2,3-Dicarboxypyridine を、NM2,3DCPyri. は 1-2,3-dicarboxypyridine を

peroxide, 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution containing the compound shown to Table 1 of 0.1 mM are prepared.

Background luminescence (a part for count/) was measured.

For the comparison, 4- phenylphenol, a hydrogen peroxide, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution not contained except a luminol Na salt were prepared, and background luminescence was measured similarly.

The light-emission measurement used the commercially available measuring device (アロカ company BLR-301), and each integrated the amount of light-emission of 1 minute from 30 seconds after reagent preparation about the 200-micro-l sample.

A result is shown to Table 1.

In addition in Table 1,

CyDTA shows Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N',N'-tetraacetic acid and monohydrate. DHEG shows N, N-Bis(2hydroxyethyl) glycine and EDDA shows Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. EDTA shows Ethylenediamine-N,N',N'-tetraacetic acid. EGTA shows O, O'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N',N'-tetraacetic acid. IDA shows Iminodiacetic acid. NTA shows Nitrilotriacetic acid. Arg. shows arginine. Asp. shows aspartic acid. Cys. shows cystine. Glu.A shows glutamic acid. His. shows histidine. Orn. shows ornithine. Tyr. shows a tyrosine. 2 and 3DCPyri. show 2,3-Dicarboxypyridine. NM2 and 3DCPyri. show 1-2,3-dicarboxypyridine. 2 and 3DCPyra show 2,3-Dicarboxypyridine.

CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, and NTA satisfy the property as a compound of this invention among these compounds. That is, it is the compound which has a chelate action which contains in structure an above-mentioned functional group or an above-mentioned its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

2,3DCPyra は 2,3-Dicarboxypyridine をそれぞれ示す。これら化合物のうち、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA、NTA は本発明の化合物としての性質を満たすもの、すなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

## 【0023】

表1からは、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA又はNTAを添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグラウンド発光が低減されていることがわかる。

## [0023]

Table 1 finds that background luminescence is clearly reduced compared with the case where non-addition or others is added, when CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, or NTA is added.

## 【0024】

## [0024]

## 【表1】

## [Table 1]

試薬名	バックグラウンド発光量 (counts/min.)	試薬名	バックグラウンド発光量 (counts/min.)
無添加	1,820	Cys.	1,295
CyDTA	197	Glu.A	1,544
DHEG	346	His.	1,535
EDDA	649	Orn.	1,889
EDTA	799	Tyr.	1,071
EGTA	272	アントラニル酸	1,422
IDA	465	2,3DCPyri.	11,784
NTA	205	NH <sub>2</sub> 2,3DCPyri.	3,317
Arg.	1,713	2,3DCPyra.	2,734
Asp.	1,361		

Row: reagent name, background luminescence

Column: reagent name: no addition, anthranilic acid

**【0025】****実施例 2**

実施例 1 においてバックグラウンド発光の低減が認められた化合物、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又は NTA について、これら化合物がペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

**【0026】**

0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩及び 0.1mM の表 2 に示した化合物を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、250 アトモル (10 $\mu$ l) の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加した。添加後 30 秒から 1 分間の発光を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 2 に示す。表 2 から、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又は NTA がバックグラウンド発光の低減効果を有し、しかもペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかる。

**【0027】****【表 2】****[0025]****Example 2**

It examined whether these compounds would not disturb the catalytic action of peroxidase about the compound with which the reduction of background luminescence observed in Example 1, CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA and IDA, or NTA.

**[0026]**

0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen peroxide, 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution containing the compound shown to Table 2 of 0.1 mM are prepared.

The Western horseradish-peroxidase solution of a 250atto mole (10 micro-l) was added.

Light-emission of 30 seconds to 1 minute was measured like Example 1 after adding.

A result is shown to Table 2.

Table 2 finds that cyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, or NTA has the reduction effect of background luminescence, and what the oxidation of peroxidase moreover is not disturbed.

**[0027]****[Table 2]**

試薬名	バックグラウンド発光 (counts/min.)	試薬添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	1,820	253,363	139.2
CyTDA	197	250,771	1272.9
DHEG	346	215,528	623.6
EDDA	649	239,032	368.3
EDTA	799	252,844	316.5
EGTA	272	231,688	851.8
IDA	465	249,905	537.4
NTA	205	240,664	173.9

Row: reagent name, background luminescence, luminescence with addition of peroxidase, S/N ratio

Column: reagent name: no addition

### 【0028】

#### 実施例 3

表 3 に示した化合物を 0.1mM 又は 1mM 濃度で使用した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、バックグラウンド低減効果を調査した。結果を表 3 に示す。なお表 3 において ADA は N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid を、DS は Dextran Sulfatesodium を、MOPS は 3-(N-Morpholino)Propane-sulfonic Acid を、2,2Bipy は 2,2Bipyridy を、o-Phn は o-Phenanthrolin をそれぞれ示す。なお、表 3 において、ADA 又はクエン酸は本発明の化合物としての性質を満たすものすなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

### 【0029】

表 3 からは、ADA、クエン酸又は DS を添加した場合に、無添

### [0028]

#### Example 3

Except having used the compound shown to Table 3 by 0.1 mM or 1 mM concentration, the operation similar to Example 1 was performed and the back-ground reduction effect was investigated.

A result is shown to Table 3.

In addition it sets to Table 3, ADA shows N-(2-acetoamido) iminodiacetic acid. DS shows Dextran Sulfatesodium. MOPS shows 3-(N-Morpholino) Propane-sulfonic Acid. 2, 2Bipy show 2 and 2Bipyridy. (omicron) -P hn shows -P(omicron) henanthrolin.

In addition, in Table 3,

ADA or a citric acid satisfies the property as a compound of this invention. That is, it is the compound which has a chelate action which contains in structure an above-mentioned functional group or an above-mentioned its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

### [0029]

Table 3 finds that background luminescence is clearly reduced compared with the case where non-addition or others is added, when ADA, a



加又はその他を添加した場合と citric acid, or DS is added.  
 比較して明らかにバックグラウンド発光が低減されていることがわかる。

【0030】

[0030]

【表3】

[Table 3]

試薬名	バックグラウンド発光量 (Counts/min)	試薬名	バックグラウンド発光量 (Counts/min)
無添加	3,524	クエン酸 0.1mM	250
コハク酸0.1mM	3,978	1.0mM	79
1.0mM	4,375	酒石酸 0.1mM	4,600
シュウ酸0.1mM	4,040	1.0mM	1,821
1.0mM	1,071	MOPS 0.1mM	9,908
ADA 0.1mM	569	1.0mM	33,763
1.0mM	364	2,2Bipy. 0.1mM	9,174
DS 0.1mM	508	o-Phn. 0.1mM	10,207

Row: reagent name, background luminescence

Column: reagent name: no addition, succinic acid, oxalic acid, citric acid, tartaric acid

【0031】

実施例4

実施例3において使用した ADA、DS 及びクエン酸について、これら化合物が実際にペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

[0031]

Example 4

About ADA, DS and the citric acid which were used in Example 3, it examined whether these compounds would not actually disturb the catalytic action of peroxidase.

【0032】

0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩及び 0.1mM の表4に示した化合物を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、250

[0032]

A 0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen peroxide, a 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution containing the compound shown to Table 4 of 0.1 mM are prepared.

The Western horseradish-peroxidase solution of a 250atto mole (10 micro-I) is added.

アドモル (10  $\mu$ l) の西洋ワサ  
 ビペルオキシダーゼ溶液を添加  
 し、添加後 30 秒から 1 分間の  
 発光を実施例 1 と同様に測定し  
 た。結果を表 4 に示す。

Light-emission of 30 seconds to 1 minute was  
 measured like Example 1 after adding.  
 A result is shown to Table 4.

### 【0033】

表 4 から、本発明の化合物であ  
 る ADA 及びクエン酸はバック  
 グランド発光の低減効果を有  
 し、かつペルオキシダーゼの酸  
 化作用を妨害しないことがわか  
 るが、DS ではバックグランド  
 発光の低減効果が認められるも  
 ののペルオキシダーゼの酸化作  
 用をも妨害していることがわか  
 る。

### 【0033】

Table 4 finds that ADA and the citric acid which  
 are the compound of this invention have the  
 reduction effect of background luminescence,  
 and do not disturb the oxidation of peroxidase.

However, in DS, although the reduction effect  
 of background luminescence observes, it finds  
 that the oxidation of peroxidase is also  
 disturbed.

### 【0034】

### 【0034】

### 【表 4】

### 【Table 4】

薬名	バックグランド発光量 (Counts/min)	ペルオキシダーゼ添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	3,524	253,363	71.9
ADA 0.1mM	569	171,911	302.1
1.0mM	364	115,223	316.5
DS 0.1mM	508	4,860	9.6
クエン酸0.1mM	250	211,125	844.5
1.0mM	79	189,262	2395.7

Row: reagent name, background luminescence, luminescence with addition of  
 peroxidase, S/N ratio

Column: reagent name: no addition, citric acid

### 【0035】

#### 実施例 5

甲状腺刺激ホルモン (TSH) に  
 対するモノクローナル抗体をペ  
 プシン消化して F (a b)' 2 化

### 【0035】

#### Example 5

After carrying out pepsin digestion of the  
 monoclonal antibody with respect to a  
 thyrotropic hormone (TSH) and forming it into

した後、ゲルろ過及び疎水クロマトグラフにより精製し、ジチオスレイトールにより還元して Fab 化した。Fab 化フラグメントはゲルろ過により精製し、これに SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) で修飾した西洋ワサビペルオキシダーゼを加え 37°C で 1 時間反応させた後、ゲルろ過により酵素標識抗体 (コンジュゲート) 画分を分取した。

#### 【0036】

分取したコンジュゲートは UV280nm の吸収を測定した後、4 °C にて保存した。反応容器に抗 TSH F (ab)2 化抗体を固相化した磁性ビーズ ( $\phi = 1.4\text{mm}$ ) 12 個を入れ、これに TSH ゼロ血清又は既知濃度 ( $4.81 \mu\text{IU}/\text{ml}$ ) 血清 100  $\mu\text{l}$  を加え、37°C 5 分間攪拌しながら反応させた後、B/F 分離を行い、0.1M NaCl、50mM トリス緩衝液、0.5 % Tween 20 (pH8.5) を含む溶液で洗浄し、先に調製したコンジュゲート (希釈液にて 200 倍希釈したもの) 100  $\mu\text{l}$  加え、更に 37°C 10 分間反応させた。次いで B/F 分離後洗浄を 5 回行った後、発光検出器 (アロカ社製 BLR-301) にセットし、0.2mM 4-Phenylphenol、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩、0.1mM CyDTA、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を含む発光試薬 200  $\mu\text{l}$  を加え、添加後 30 秒から 1 分間の発光量を実施例 1 と同様にして積算した。な

F(ab)'2, the gel filtration and a hydrophobic chromatograph refine.

It reduced by the dithiothreitol and it Fab-ized. The gel filtration refines Fab-ized fragment.

The Western horseradish peroxidase modified by SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) is added to this. After carrying out 1 hour reaction by 37 degrees-Celsius, the enzyme label antibody (conjugate) fraction was aliquoted by the gel filtration.

#### 【0036】

After the aliquoted conjugate measured absorption of UV280 nm, it was preserved by 4 degrees-Celsius.

12 piece of the magnetic beads ( $\phi$ ) (=1.4 mm) which carried out solidified the anti-TSHF(ab)2-ized antibody is put into the reaction container.

TSH zero serum or 100 micro-l of known concentration ( $4.81 \text{ micro-IU}/\text{ml}$ ) serums are added to this. After making it react, stirring 5 minutes of 37 degrees-Celsiuses, B / F separation is performed. It washes with 0.1MNaCl, 50 mM tris buffers, and the solution which contains Tween20 (pH8.5) 0.5%.

Conjugate (thing was diluted 200 times by dilution liquid) 100 micro-l prepared previously is added. Furthermore it was made to react 10 minutes of 37 degrees-Celsiuses.

Subsequently it sets to the light-emission detector (Aloka Co., Ltd., BLR-301), after performing B / washing after F separation 5 times. 0.2 mM4-Phenylphenol, 1.0 mM hydrogen peroxide, a 0.5 mM luminol Na salt, 0.1 mM CyDTA, and 200 micro-l of the light-emission reagents containing 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) are added. The amount of light-emission of 30 seconds to 1 minute was integrated like Example 1 after adding.

In addition the measurement was performed by a unit of 5 times about the same test liquid.

お測定は、同一の被検液について 5 回ずつ行った。測定結果（平均値、標準偏差、変動値、2SD 法による検出下限界濃度を表 5 に示す。

**【0037】**

表 5 から CyDTA 添加系の S/N 比（陽性血清での発光量／ゼロ血清の発光量）は 851 であるのに対し、CyDTA 非添加系での S/N 比は 147 であり、S/N 比的に約 6 倍改善されたことがわかる。また CyDTA を添加した場合の検出下限界濃度は 0.004 であるのに対し、これを添加しなかった場合では 0.017 であり、検出下限界濃度も約 6 倍改善されたことがわかる。

**【0038】**

**【表 5】**

Measurement result (the detection minimum field concentration by the mean value, the standard deviation, the variation, and 2SD method is shown to Table 5)

**[0037]**

S/N ratio (the amount of light-emission of the amount of light-emission / zero serum in a positive serum) of Table 5 to CyDTA addition type is 851. S/N ratio of CyDTA the non-adding type with respect to it is 147.

It improves about 6 times in S/N ratio, and an octopus is found.

Moreover the detection minimum field concentration at the time of adding CyDTA is 0.004. It is 0.017 when this is not added with respect to it.

Detection minimum field concentration also finds to have improved about 6 times.

**[0038]**

**[Table 5]**

	発光量 (counts/min)			
	CyDTA添加	CyDTA無添加	CyDTA添加	CyDTA無添加
TSH濃度 ( $\mu$ IU/ml)	陰性血清 0	陰性血清 0	陽性血清 48.1	陽性血清 48.1
平均値	131	789	111,458	116,279
標準偏差	47	201	7,697	6,312
変動値(%)	36	25	7	5
検出下限界濃度	-	-	0.004	0.017

Row: luminescence

Column: TSH concentration, mean value, standard deviation, variation, detection minimum field concentration; luminescence: CyDTA addition, negative serum; CyDTA non-addition; positive serum

## **DERWENT TERMS AND CONDITIONS**

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

**Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation**

**Please visit our home page:**

[WWW.DERWENT.CO.UK](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

[WWW.DERWENT.CO.JP](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**